

β -淀粉样蛋白与膜脂作用后的交联研究^①

石 镜 明

西藏民族大学 基础医学院/高原环境与疾病相关基因研究实验室, 陕西 咸阳 712082

摘要: β 淀粉样蛋白(A β)与细胞膜相互作用形成寡聚体存在于膜脂内, 聚丙烯酰胺凝胶电泳常用于分析这些膜内寡聚体的结构和状态, 但十二烷基硫酸钠(SDS)使得寡聚体原有的结构极易被破坏, 使用合适的交联剂来稳定蛋白在膜上的状态, 从而获取寡聚体本身的结构. 用双琥珀酰亚胺辛二酸酯磺酸钠盐(BS³)对 A β 42 进行交联, 将 BS³ 与戊二醛交联进行比较分析, 通过电泳、脂质体技术, 并采用电镜照片对照分析. 实验结果显示: 1)BS³ 交联后的样品能保持蛋白原先的状态; 2)BS³ 不会导致蛋白过度交联, 很适合作为分析膜脂与 β 淀粉样蛋白相互作用的交联剂. 因此, 报道了 BS³ 分析 β 淀粉样蛋白这种易聚集蛋白在插膜后的结构, 且 BS³ 可以替代戊二醛成为更有效的交联剂, 这将为 β 淀粉样蛋白及其他易聚集蛋白插膜提供很好的研究方法.

关 键 词: β 淀粉样蛋白; 双琥珀酰亚胺辛二酸酯磺酸钠盐; 寡聚体; 脂质体; 交联

中图分类号: Q513

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)06-0040-07

阿尔茨海默病(Alzheimer Disease, AD)脑组织主要病理变化是 β 淀粉样蛋白(Amyloid beta peptide, A β)在胞外形成神经炎斑以及 tau 蛋白磷酸化(p-tau)后形成纤维化缠结(neurofibrillary tangles, NFTs), 研究表明, A β 很可能是致病主因^[1]. AD 脑脊液中的 A β (A β 42), 总 tau 蛋白(T-tau 蛋白), 以及磷酸化 tau 蛋白作为生物标识物(Biomarkers)被认为是检测 AD 不可缺少的工作^[2]. β 前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)经过 β -分泌酶和 γ -分泌酶水解得到以 40 及 42 个肽为主的 A β 40 及 A β 42, A β 42 寡聚体不是某个单一成分的聚集体, 例如, ADDL(A β -derived diffusible ligands)电镜下看似非常均一, 却是由从 3 聚至 24 聚体不等的几十种混合物形成^[3, 4], 很难确定几聚体有毒性. 使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 A β 42 的聚集状态, 发现 A β 42 寡聚体很容易受到变性剂十二烷基磺酸钠(SDS)的破坏, 聚丙烯酰胺胶孔道的挤压也会改变蛋白本身的状态, A β 单体和寡聚体电泳条带仅以单体、三聚和四聚形式出现^[5], 从而未能显示出其本身的聚集状态.

A β 与生物膜的相互作用一直受到关注, 主要体现在 A β 通过 APP 水解产生, 经囊泡分泌到胞外, A β 与膜相互作用的毒性包括: 1)分泌到胞外的 A β 可能通过插膜形成离子通道寡聚体, 从而引起神经细胞膜内外离子流失去平衡; 2)A β 与细胞膜受体结合导致下游事件^[6-8]; 3)A β 寡聚体在细胞膜上参与脂质过氧化反应, 导致磷脂和蛋白的过氧化^[9]. 为保证电泳前后寡聚体结构不被 SDS 破坏, 研究者使用戊二醛交联或光交联^[10-12]来达到分析目的. 戊二醛作为一种细胞和组织的交联剂被广泛报道^[13], 但戊二醛交联 A β 的方法并不实用, 原因在于戊二醛能够过度交联蛋白, 使得单体被交联成寡聚体, 从而没有达到交联蛋白的本来目的, 因此, 本文作者认为 BS³ 可能成为一种更加实用的交联剂, 作为一种易溶于水的化合物, BS³ 在蛋白及抗体的交联过程中曾有过报道^[14-15], 本文将详细分析 BS³ 对于脂质体与 A β 42 样品的交联, 以获得区分 A β 及各种易聚集蛋白与膜作用后的结构, 这将为 AD 病理机制的研究提供很好的帮助.

① 收稿日期: 2016-04-03

基金项目: 西藏自然科学基金项目(12KJZRZMY02).

作者简介: 石镜明(1982-), 男, 湖南祁阳人, 讲师, 博士, 主要从事蛋白质与细胞膜相互作用的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

BS³ 购自 Sigma; A β 42 蛋白及其他蛋白均购自 rpeptide 公司(Athens, GA, 美国); 二甲基亚砜 DMSO 购自 Sigma; 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine semisynthetic (DPPC, 纯度 > 99%) 及 DPPS, Cholesterol(Chol), Sphingomyelin(Sm, Brain, Porcine)和其他磷脂均购自 Avanti(Avanti Polar Lipids, 美国); 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), 鼠源单克隆抗体 DE2, ECL 显色剂购自 millpore (Millipore, MA); F-12 培养基 (Ham's F-12, BioSource, 澳大利亚); 透射电子显微镜型号 Tecnai G20 (FEI, 荷兰).

1.2 方法

1.2.1 A β 42 单体化处理

1 mg A β 旋涡振荡 5 min, 4 °C 慢摇过夜, 按 8.6 μ L/管分装, N₂ 流吹干, -80 °C 冻存备用^[16].

1.2.2 ADDL 寡聚体和原纤维寡聚体的制备

ADDL 的制备条件: A β 42 加入 F12 培养基中使得终浓度为 100 μ mol/L, 在 4 °C 孵育 24 h^[17]; 原纤维寡聚体的制备条件: A β 42 加入到 Tris 缓冲液(50 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, pH 值为 7.4)浓度为 200 μ mol/L, 室温下慢摇孵育 24 h^[5].

1.2.3 BS³ 交联及电泳条件

将 A β 42 加入 PBS 缓冲液中, 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 BS³, 冰浴交联 1 min, 加入 1 mol/L Tris, pH 值为 7.4 的终止液终止 5 min, 电泳时加入 5 倍上样缓冲液, 90 °C 煮 5 min 上样. 戊二醛交联, 使用 0.3 mmol/L 戊二醛, 交联 1 min 或更长时间, 加入 1 mol/L Tris, pH 值为 7.4 的终止液终止, 电泳时加入 5 倍上样缓冲液, 90 °C 孵育 5 min 上样. 选用 4% 浓缩胶和 16.5% Tris-Tricine 分离胶进行实验.

1.2.4 脂质体(liposome)制备

制备方法如下: DPPC 或脂筏加入到玻璃瓶中, DOPC, Chol 和 SM 比例为 1 : 1 : 1^[18-19], N₂ 流吹干蛋白磷脂混合物, 并置入真空干燥器干燥 2 h 后加入磷酸缓冲液(PBS, pH 值为 7.4), 并使磷脂终浓度达到 1 mg/mL, 磷脂蛋白样品涡旋 5 min 后, 反复冻融 10 次, 采用推挤法制备采用 Avanti Polar Lipids (USA)公司生产的 Avanti 小型挤压器, 聚碳酸酯膜(polycarbonate membrane)含孔径为 300 nm, 用于控制脂质体的大小. 样品在相变温度以下用小型挤压器挤膜备用^[18-19].

1.2.5 电镜样品制备

用 A β 42 溶液 2 μ L 加到放电/亲水化处理的碳膜上, 孵育 1 min 后, 用超纯水清洗, 然后用 1% 磷钨酸钠负染 1 min. 吸去多余液体, 将筛格在空气中干燥备用.

2 实验结果

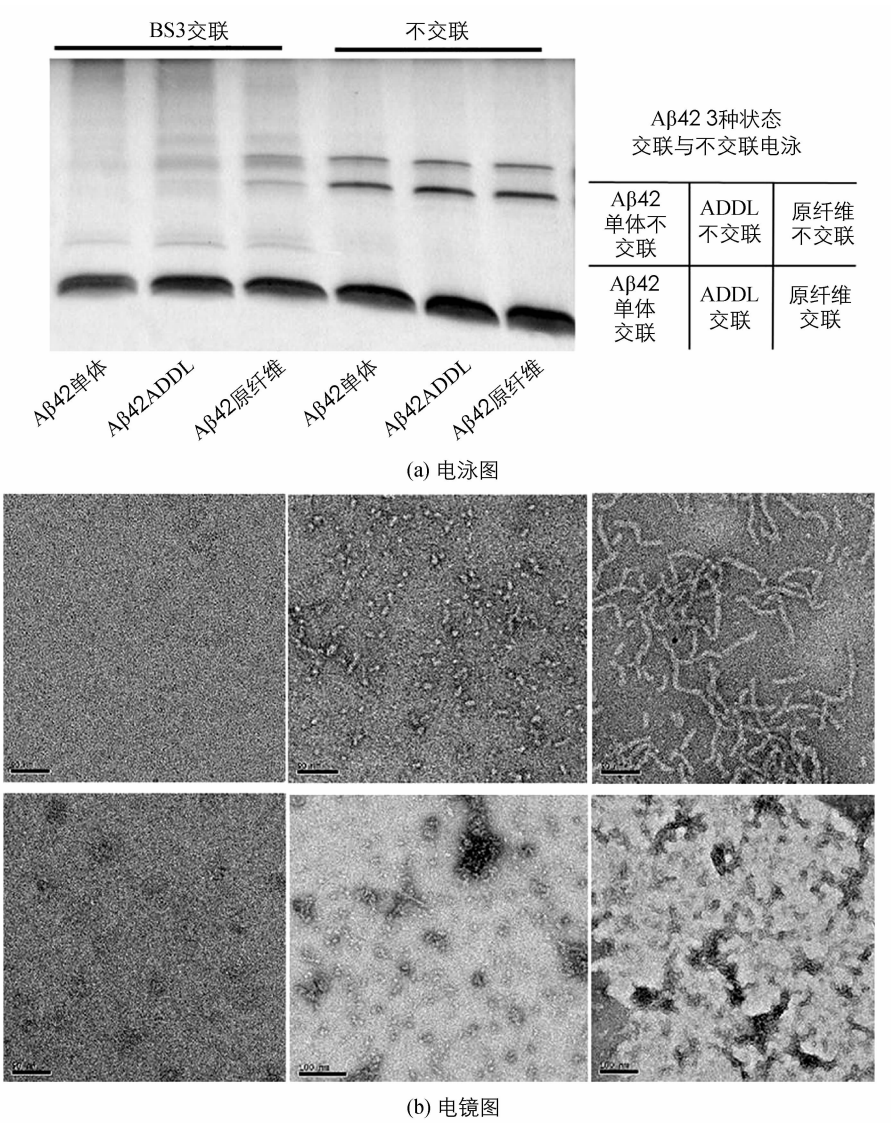
2.1 戊二醛与 BS³ 对 A β 单体的交联控制

双琥珀酰亚胺辛二酸酯磺酸钠盐[Bis(sulfosuccinimidy)], BS³ 是一种水溶性的琥珀酰亚胺酯(NHS-ester), BS³ 溶解后会迅速脱去两端含 N 部分, 在分子的两端与蛋白的 α -氨基酸或赖氨酸反应, A β 42 包含 Lysine-18 和 Lysine-28 与 BS³ 产生交联, 该反应具有竞争性, 反应可以通过 1 mol/L Tris 或者 1 mol/L Glycine 溶液来终止, 交联的原理如图 1a 所示^[20-21].

先前工作对 A β 1-40 与膜相互作用的交联采用 12 mmol/L 戊二醛, 交联 10 min^[12], 预实验使用 A β 42 单体重复该实验, 结果显示 A β 42 单体形成严重寡聚, 本文采用 0.3 mmol/L 极低戊二醛及 BS³ 浓度, 并采用不同的交联时间, 在冰浴条件下对 A β 42 单体进行交联比较, 以避免过度交联, 使用终浓度为 5 μ mol/L A β 42 及 0.3 mmol/L BS³ 对 A β 42 单体进行交联, 通过对交联时间的控制, 结果如图 1b 所示, 戊二醛出现较严重的交联, 而 0.3 mmol/L BS³ 作为交联剂只要控制交联时间在 5 min 便可控制蛋白原来的状态. 对各种不同长度的 A β 单体进行交联, 0.3 mmol/L 戊二醛交联 2 min, 0.3 mmol/L BS³ 交联 2 min, BS³ 没有明显变化, 戊二醛交联的所有单体蛋白均出现多聚体条带(图 1c). 正常情况下, 如果使用交联剂进行交联后

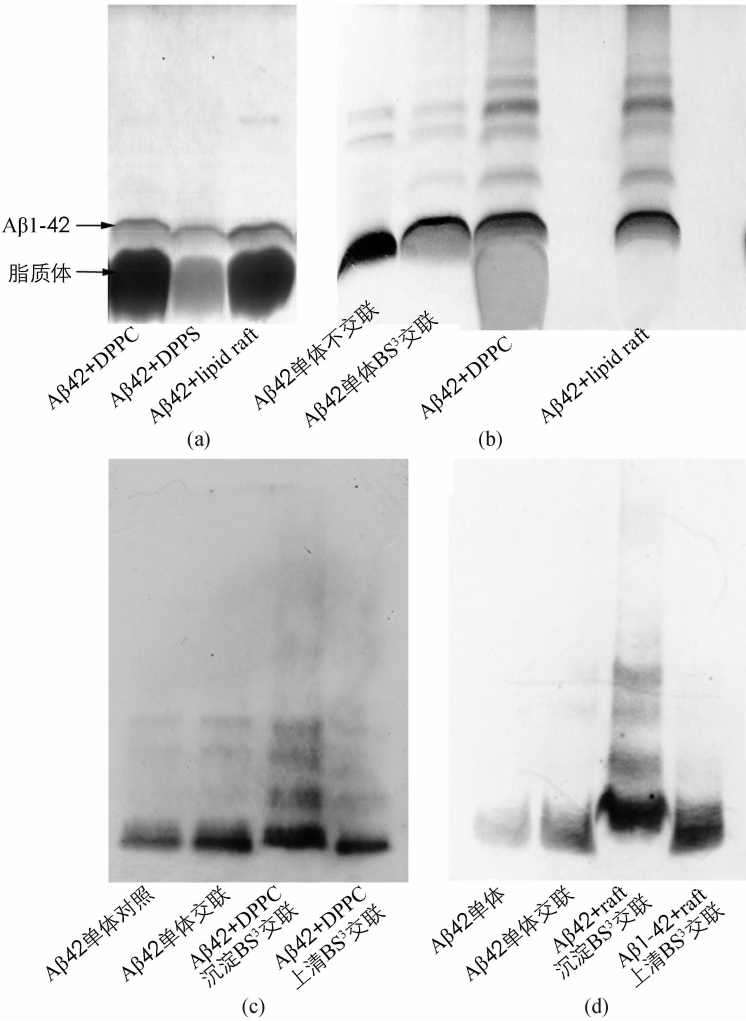
2.2 BS³ 对 A β 42 3 种不同聚集形式的交联

ADDL 与原纤维分别是 A β 42 的球形和纤维状态^[5,17], 通过 16.5% Tris-tricine 胶分析单体, ADDL 及原纤维 3 种形式, 结果如图 2, 在未交联情况下, A β 42 3 种状态条带没有明显差别, 而使用 0.3 mmol/L BS³ 交联 2 min 后, 3 种蛋白条带之间差别较大, 单体交联后, 电泳出现三聚和四聚明显减少, ADDL 除三聚和四聚外还出现其他五聚体和更高的寡聚形式, 原纤维经过交联后, 四聚和三聚减少, 但其他形式的聚集体明显存在.



2.4 电镜照片显示 BS³ 对 Aβ₄₂ 的交联情况

使用透射电镜观察 Aβ₄₂ 的单体, ADDL 及原纤维 3 种形式的交联情况, 图 4a 是未交联的电镜照片, 使用 0.3 mmol/L BS³ 交联的 Aβ₄₂ 样品 2 min, 如图 4b, 可以看出, 脂质体经过 BS³ 交联后有轻度聚集, 这说明 BS³ 对 Aβ₄₂ 的交联很温和, 电镜结果与上述电泳结果相符合.

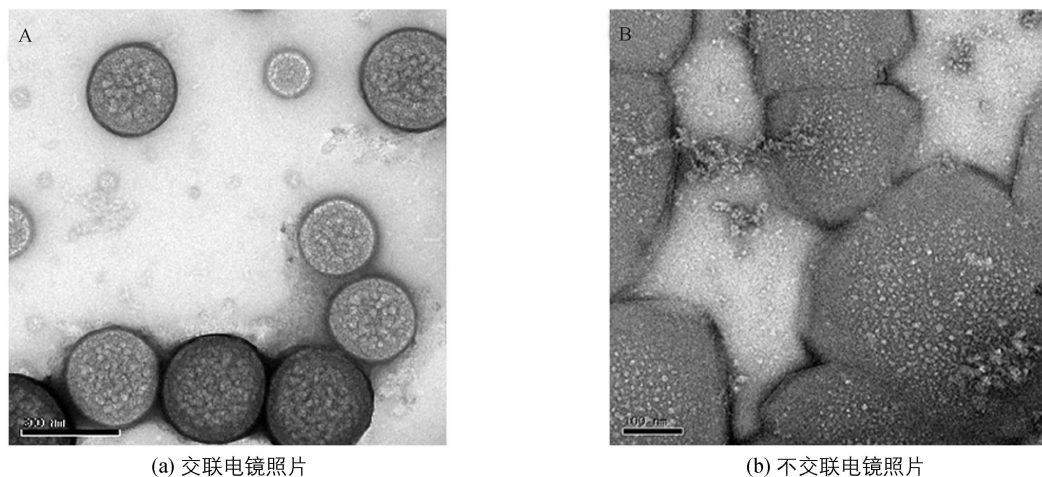


注: (a) 银染分析 Aβ₄₂ 单体与 3 种不同脂质体共孵育后的电泳条带, 在不交联的情况下, Aβ₄₂ 单体 + 脂质体难以分析其寡聚状态. (b) Aβ₄₂ 单体及 DPPC 及 lipid raft 脂质体共孵育后, 离去纤维, 样品交联后电泳条带, 使用 0.3 mmol/L BS³ 交联 2 min. (c) Aβ₄₂ 单体加入 DPPC 脂质体后的 Western Blot 结果, 与 Aβ₄₂ 单体交联相比, Aβ₄₂ 单体 + 脂质体样品明显形成寡聚, 但上清没有明显的寡聚. (d) Aβ₄₂ 单体加入 DPPC 脂质体后的 Western Blot 结果.

图 3 Aβ₄₂ 与 DPPC 及 lipid raft 脂质体相互作用后的电泳分析

综上所述, 如同一些有益的蛋白质一样^[22], Aβ 寡聚体作为毒性蛋白, 其作用也受到很大的关注, 一般认为可溶性 Aβ 寡聚体对细胞具有毒性作用, 在对 Aβ 寡聚体进行分析和检测时, Tris-tricine 电泳是最常用的实验办法, 戊二醛作为交联剂进行电泳曾被报道^[23-24], 然而使用电泳检测 Aβ 寡聚体, 发现戊二醛交联后会使 Aβ 单体产生聚集, 也就是说, 单体经过过度交联后呈现出来的是寡聚体, 因而不能准确地对 Aβ 寡聚形式进行分析. 而 BS³ 则能体现出 Aβ 各聚集状态之间的差异, 同时, 不容易对 Aβ₄₂ 产生过度交联, 结果如图 1, 图 2. 因此使用 BS³ 交联可以显示出蛋白条带的特异性, 从而达到区分 Aβ 不同聚集形式的效果, 且这种交联分析适合于插入脂质体的 Aβ₁₋₄₂ 蛋白样品, 结果如图 3, 图 4, 这说明 BS³ 也可对细胞膜上蛋白寡聚形式进行交联分析. 由实验结果可以发现 BS³ 对 Aβ₄₂ 不同状态, 及 Aβ₄₂ 插入脂质体后的聚集形式具有稳定作用, 可以作为有效的交联剂用于淀粉样蛋白的分析, 其主要有以下几个方面的作用和优点: 1) BS³ 适度交联, 在 Tris-Tricine 电泳中很容易分辨出 Aβ₄₂ 单体, ADDL 及原纤维等形态; 2) 相对于戊二醛的交联, BS³ 显得更合适, 不会导致过度交联寡聚物的产生; 3) 脂质体膜上蛋白的寡聚体状态可以

通过 BS³ 交联后使用电泳分析, 从而检测 A β 42 在膜上的状态.



(a) 交联电镜照片

(b) 不交联电镜照片

注: DPPC 脂质体加入 1 μ mol/L A β 42 共孵育 2 h 后的电镜照片, 标尺为 100 nm.

图 4 A β 42 与脂质体相互作用后的电镜分析

3 讨 论

近几十年 A β 寡聚体的形式和毒性作用受到足够重视, 可溶性 A β 寡聚体对细胞具有毒性作用, 电泳分析 A β 寡聚体是最常用的办法, 戊二醛作为交联剂进行电泳曾被报道, 然而在 A β 分析中, 发现戊二醛很容易过度交联, 即使是极低的交联剂浓度和极短的交联时间, 单体状态的 A β 也会产生聚集, 这就失去了 A β 本来的状态, 而 BS³ 对蛋白的交联相对“温和”, 在反映 A β 本来状态的同时, BS³ 不容易对 A β 42 产生过度交联, 结果如图 2, 图 3.

使用 BS³ 交联可以显示出蛋白条带的特异性, 从而达到区分 A β 不同聚集形式的效果, 且这种交联分析不仅可以用于合成或表达的 A β 样品, 在脂质体实验中同样适合. 因此, 在 A β 与 AD 的毒性机制研究中, 使用 BS³ 交联的手段可以起到很好的帮助作用.

参考文献:

- [1] TARASOFF-CONWAY J M, CARARE R O, OSORIO R S, et al. Clearance Systems in the Brain-Implications for Alzheimer Disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(8): 457-470.
- [2] FORTEA J, VILAPLANA E, ALCOLEA D, et al. Cerebrospinal Fluid beta-Amyloid and Phospho-Tau Biomarker Interactions Affecting Brain Structure in Preclinical Alzheimer Disease [J]. *Ann Neurol*, 2014, 76(2): 223-230.
- [3] BENILOVA I, KARRAN E, DE STROOPER B. The toxic Abeta Oligomer and Alzheimer's Disease: An Emperor in Need of Clothes [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(3): 349-357.
- [4] JANA M K, CAPPAL R, PHAM C L, et al. Membrane Bound tetramer and Trimer A β Oligomeric Species Correlate with Toxicity Towards Cultured Neurons [J]. *J Neurochem*, 2016, 136(3): 594-608.
- [5] AHMED M, DAVIS J, AUCCOIN D, et al. Structural Conversion of Neurotoxic Amyloid-Beta(1-42) Oligomers to Fibrils [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(5): 561-567.
- [6] SKAPER S D, FACCI L, GIUSTI P. Intracellular Ion Channel CLIC1: Involvement in Microglia-Mediated Beta-Amyloid Peptide(1-42) Neurotoxicity [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(9): 1801-1808.
- [7] PUZZO D, ARANCIO O. Amyloid-Beta Peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde [J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33(S1): 111-120.
- [8] PANDYA A, YAKEL J L. Allosteric Modulator Desformylflustrabromine Relieves the Inhibition of Alpha2beta2 and Alpha4beta2 Nicotinic Acetylcholine Receptors by Beta-Amyloid(1-42) Peptide [J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 45(1): 42-47.
- [9] BUTTERFIELD D A, SWOMLEY A M, SULTANA R. Amyloid Beta-Peptide (1-42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(8): 823-835.
- [10] LEVINE H. Soluble Multimeric Alzheimer Beta(1-40) Pre-Amyloid Complexes in Dilute Solution [J]. *Neurobiol Aging*, 1995, 16(5): 755-764.
- [11] BITAN G, KIRKITADZE M D, LOMAKIN A, et al. Amyloid Beta-Protein (Abeta) Assembly: Abeta 40 and Abeta 42

- Oligomerize Through Distinct Pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(1): 330—335.
- [12] QUIST A, DOUDEVSKI I, LIN H, et al. Amyloid ion Channels; A Common Structural Link for Protein-Misfolding Disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(30): 10427—10432.
- [13] SOOKLERT K, CHATTONG S, MANOTHAM K, et al. Cytoprotective Effect of Glutaraldehyde Erythropoietin on HEK293 Kidney Cells After Silver Nanoparticle Exposure [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 597—605.
- [14] SCHMIDT C, ROBINSON C V. A Comparative Cross-Linking Strategy to Probe Conformational Changes in Protein Complexes [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(9): 2224—2236.
- [15] IVANOV K I, BASIC M, VARJOSALO M, et al. One-Step Purification of Twin-Strep-Tagged Proteins and Their Complexes on Strep-Tactin Resin Cross-Linked with Bis(Sulfosuccinimidyl) Suberate (BS3) [J]. *J Vis Exp*, 2014, 86: e51536.
- [16] STINE W B, J R, DAHLGREN K N, KRAFFT G A, et al. In Vitro Characterization of Conditions for Amyloid-Beta Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11612—11622.
- [17] LAMBERT M P, BARLOW A K, CHROMY B A, et al. Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from Abeta1—42 are Potent Central Nervous System Neurotoxins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6448—6453.
- [18] GANDHAVADI M, ALLENDE D, VIDAL A, et al. Structure, Composition, and Peptide Binding Properties of Detergent Soluble Bilayers and Detergent Resistant Rafts [J]. *Biophys J*, 2002, 82(3): 1469—1482.
- [19] ZHANG Y J, SHI J M, BAI C J, et al. Intra-Membrane Oligomerization and Extra-Membrane Oligomerization of Amyloid-Beta Peptide are Competing Processes as a Result of Distinct Patterns of Motif Interplay [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(1): 748—756.
- [20] KNOLLER S, SHPUNGIN S, PICK E. The Membrane-Associated Component of the Amphiphile-Activated, Cytosol-Dependent Superoxide-Forming NADPH Oxidase of Macrophages is Identical to Cytochrome b559 [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(5): 2795—2804.
- [21] COX G W, MATHIESON B J, GIARDINA S L, et al. Characterization of IL-2 Receptor Expression and Function on Murine Macrophages [J]. *J Immunol*, 1990, 145(6): 1719—1726.
- [22] 杨雅莉, 张 翼, 李 毓, 等. 鼠妇富含蛋白多肽提取物的镇痛作用研究 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2014, 39(3): 77—81.
- [23] QUIST A, DOUDEVSKI I, LIN H, et al. Amyloid Ion Channels; A Common Structural Link for Protein-Misfolding Disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(30): 10427—10432.
- [24] LAL R, LIN H, QUIST A P. Amyloid Beta Ion Channel: 3D Structure and Relevance to Amyloid Channel Paradigm [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(8): 1966—1975.

On Structure of β -amyloid Peptide after Interaction with Membrane Lipid

SHI Jing-ming

*Plateau Environment and Diseases Related Genes Research Laboratory, School of Medicine,
Xizang Minzu University, Xian'yang Shanxi 712082, China*

Abstract: Electrophoresis is often used to analyze the structure and state of A β oligomers which bind and adsorb with membrane. However, due to the presence of denaturing SDS, oligomers are easily broken during electrophoresis, which makes it very hard to get true A β aggregate states. So cross-linking was used to steady the structure state. In this paper, bis(sulfosuccinimidyl) (BS³) is used to cross-link A β 42 oligomers before electrophoresis. These result compared with a previously reported A β crosslinking agent glutaraldehyde. Electron microscopy and liposome were used to observe the crosslinking results. It is quite apparent that BS³ is more sensitive in detecting intra-membrane A β oligomers and extra-membrane A β oligomers states. BS³ crosslinking with A β which would provide an efficient method to analyze A β protein and other easily aggregated proteins in vivo and in vitro studies.

Key words: amyloid- β Peptide; BS³; oligomer; liposome; crosslink